

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FI04/000776

International filing date: 17 December 2004 (17.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FI
Number: 20031867
Filing date: 19 December 2003 (19.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 February 2005 (24.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

Helsinki 27.1.2005

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT



Hakija
Applicant

Mobidiag Oy
Helsinki

Patenttihakemus nro
Patent application no

20031867

Tekemispäivä
Filing date

19.12.2003

Kansainvälinen luokka
International class

C12Q

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Nukleiinihappokoettimia, universaaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista, tiivistelmästä ja piirustuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims, abstract and drawings, originally filed with the Finnish Patent Office.

Marketta Tehikoski
Apulaistarkastaja

Maksu 50 €
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001 Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No. 1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and Registration of Finland.

Osoite:	Arkadiankatu 6 A	Puhelin:	09 6939 500	Telefax:	09 6939 5328
	P.O.Box 1160	Telephone:	+ 358 9 6939 500	Telefax:	+ 358 9 6939 5328
	FIN-00101 Helsinki, FINLAND				

Nukleiinihappokoettimia, universaaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään

Keksinnön ala

Keksintö koskee nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita, jotka ovat käyttökelpoisia bakteerien tunnistamisessa ja bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoimisessa. Erityisesti keksintö koskee spesifisiä nukleiinihappokoettimia, jotka ovat peräisin infektoita aiheuttavien bakteerien RNA-polymeraasia koodaavan geenialueen alayksikköä B, rpoB (DNA directed RNA polymerase subunit B), konservoituneiden alueiden lähellä olevilta hypervarioivilta alueilta. Keksintö koskee myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin rpoB:n konservoituneilta alueilta. Lisäksi keksintö koskee näiden nukleiinihappokoettimien ja universaalien alukkeiden käyttöä bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoinnissa sekä diagnostisia menetelmiä, joissa käytetään näitä nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita.

15 Keksinnön tausta

Hengitystieinfektiot ovat yleinen syy lääkärin vastaanotolla käyntiin Suomessa ja maailmanlaajuisesti. Hengitystieinfektioita aiheuttaa virusten lisäksi suuri joukko erilaisia bakteereja. *Streptococcus pyogenes* (A-ryhmän streptokokki) on tärkeä nielurisatulehduksen, tonsilliitin, aiheuttaja. Sen aiheuttamaan hoitamattomaan tonsilliittiin liittyy vakavien komplikaatioiden, kuten peritonsillaarisen absessin, riski. Lisäksi *S. pyogenes* -tonsilliittien jälkitauteina voi esiintyä reumakuumetta ja glomerulonefriittiä, jotka molemmat ovat vakavia, jopa potilaan henkeä uhkaavia tauteja. Avohoitokeuhkokuumeiden tärkeimpiä taudinaiheuttajia ovat virusten lisäksi *Streptococcus pneumoniae* (pneumokokki), *Mycoplasma pneumoniae* ja *Chlamydia pneumoniae*, joista pneumokokki on yleisin ja vakavin keuhkokuumeen aiheuttaja. Harvinaisempi keuhkokuumeen aiheuttaja on *Legionella pneumophila*. *Mycobacterium tuberculosis* -bakteeri puolestaan aiheuttaa keuhkotuberkuloosia. Poskiontelotulehduksen (sinuiitti) ja välikorvatulehduksen (otitis media) aiheuttajia ovat pneumokokin lisäksi mm. *Haemophilus influenzae* ja *Moraxella catarrhalis*.

Tällä hetkellä hengitystieinfektioiden diagnostiikka on bakteerien osalta pääasiassa bakteeriviljelyn varassa. Bakteerien viljeleminen on kuitenkin suhteellisen hidasta ja viljelyyn perustuvat diagnostiset menetelmät antavat tuloksia yleensä vasta vuorokausien, joskus jopa viikkojen kuluttua näytteen otosta. Bakteerien viljely ei myöskään aina onnistu laboratorio-olosuhteissa.

Tämä voi johtua joko siitä, että käytetty viljelymenetelmä ei ole kyseiselle bakteerille soveltuva tai siitä, että potilaalle on ennen näytteen ottamista annettu antibioottihoitoa. Nielutulehdusten diagnostiikassa antigeenin osoitukseen perustuvat pikamenetelmät ovat hyviä bakteeriviljelyä täydentäviä menetelmiä, mutta niiden ongelmana on suppea lajivalikoima (A-ryhmän streptokokki). Joidenkin bakteeri-infektioiden (esim. *C. pneumoniae* ja *M. pneumoniae*) diagnostiikassa voidaan käyttää myös serologisia menetelmiä, mutta nämä menetelmät antavat tuloksia vasta päiviä tai useita viikkoja infektion alkamisen jälkeen eivätkä näin ollen välttämättä auta potilaan akuutissa hoidossa.

10 Molekylaariset nukleiinihappojen monistamiseen ja hybridisaatioon perustuvat menetelmät pyrkivät ratkaisemaan edellä kuvatut bakteeriviljelyyn liittyvät ongelmat. Niiden avulla bakteeri todetaan ja tunnistetaan samanaikaisesti, mikä nopeuttaa diagnostiikkaa, eikä aikaa vieviä jatkoviljelyjä tarvita. Antibiootit eivät myöskään häiritse molekylaarisia menetelmiä samassa määrin
15 kuin bakteeriviljelyä.

Eräs bakteeridiagnostiikassa käytetyistä molekylaarisista menetelmistä on ns. yleis-bakteeri-PCR, joka perustuu ns. universaalien alukkeiden käyttöön. Tällä hetkellä käytössä olevissa yleis-bakteeri-PCR-menetelmissä käytetään ribosomaalista RNA:ta (16S rDNA/rRNA tai 23S rDNA/rRNA) koodaavien geenien konservoituneille DNA-alueille sijoittuvia alukkeita. Yleis-bakteeri-PCR:ään perustuvassa bakteerien tunnistuksessa varsinainen tunnistusvaihe toteutetaan sekvensoimalla saatu PCR-tuote. (Katso esim. EP-patentti 613 502, US-patentti 6 001 564 ja US-patenttihakemus 0 020 055 101). Multibakteeri-infektioiden suora tunnistus vaatii kloonamalla
20 tuotettuja transformanttikirjastojen tutkimista sekvensoimalla.

Yleis-bakteeri-PCR-menetelmää on jonkin verran sovellettu kliiniseen bakteeridiagnostiikkaan, vaikka se soveltuukin parhaiten bakteeri- ja sienilajien tunnistukseen puhdasviljelmistä, ja tähän tarkoitukseen on kehitelty myös kaupallisia testejä, kuten esim. MicroSeq (Applied Biosystems). Nämä
30 testit eivät kuitenkaan ole laajalti käytössä, sillä PCR-tuotteen sekvensointi on hidasta ja työlästä ja itse testit ja niiden käyttöön tarvittavat laitteistot, kuten esim. sekvensointilaitteet, ovat kalliita ja testien suorittaminen vaatii koulutettua henkilökuntaa.

Toinen bakteeridiagnostiikassa jonkin verran käytetty menetelmä on spesifiisiin oligonukleotideihin perustuva klassinen PCR tai sen sovellutus multiplex-PCR-menetelmä. Tässä menetelmässä monistamiseen käytetään bak-
35

teerilajispesifisten alukkeiden seosta. Hendolin *et al.* [Journal of Clinical Microbiology. 35 (11):2854-2858, 1997] käyttivät multiplex-PCR-menetelmää välikorvantulehdusta aiheuttavien bakteerien tunnistukseen. Kyseisessä menetelmässä käytettiin toisena PCR-alukkeena universaalia, 16S-rRNA:n konservoituneelle geenialueelle sijoittuvaa aluketta ja toisena PCR-alukkeena alukeseosta, joka koostuu neljälle eri bakteerilajille spesifisistä alukkeista. Bakteerilajispesifiset alukkeet oli suunniteltu siten, että aikaansaatu PCR-tuote on eripituinen riippuen siitä, mistä bakteerilajista se on peräisin, jolloin tunnistus perustuu syntyvän PCR-tuotteen pituuteen. Vaikka multiplex-PCR menetelmä onkin suhteellisen herkkä ja nopea, menetelmällä on haittapuolia. Tiedetään, että lyhyemmät DNA-jaksot monistuvat tehokkaammin kuin pidemmät jaksot. Jos siis samassa näytteessä on kahta bakteeria, monistuu lyhyemmän tuotteen antavan bakteerin DNA todennäköisesti tehokkaammin, mikä vaikuttaa menetelmän herkkyyteen. Lisäksi multiplex-PCR-menetelmällä pystytään samanaikaisesti tunnistamaan vain muutamia bakteerilajeja, sillä käytännössä on mahdotonta suunnitella kymmeniä spesifisiä PCR-alukkeita siten, että ne toimisivat samoissa PCR-olosuhteissa ja että syntyvät PCR-tuotteet eroaisivat pituudeltaan riittävästi toisistaan. Multiplex-PCR ei siis sovellu esim. hengitystieinfektiodiagnostiikkaan, jossa kliinisesti tärkeitä taudinaiheuttajia halutaan tutkia huomattavasti enemmän kuin kymmenen yhdellä kertaa.

Myös ribosomaalisen RNA:n käyttöön liittyy ongelmia. Lähisukuisten bakteerilajien erottaminen toisistaan rRNA-molekyylien avulla on vaikeaa, koska näiden molekyylien sekvensseihin ei evoluution aikana ole kertynyt riittävästi eroja. Ja vaikka lajien välisiä eroja löytyisikin, nämä varioivat kohdat ovat yleensä jakautuneet koko rRNA-molekyylin alueelle (esim. 16S rRNA:n pituus on noin 1500 emästä), mikä rajoittaa diagnostiikassa hyödynnettävien molekyylien menetelmien käyttöä. Käytännössä lähisukuiset bakteerit voidaan siis erotella toisistaan vain sekvensoimalla koko rRNA:ta koodaava geeni, mikä ei sekään aina välttämättä riitä erottamaan lajeja toisistaan.

30 **Keksinnön lyhyt selostus**

Esillä oleva keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön välineitä ja keinoja, jotka ovat käyttökelpoisia infektioita aiheuttavien, erityisesti hengitystieinfektioita sekä korva-, nenä- ja kurkkutauteja, aiheuttavien bakteerien diagnostiikassa, mutta joilla ei ole edellä kuvattuja bakteerien diagnostiikkaan liittyviä haittoja. Erityisesti keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön uusia molekyyliin menetelmiin perustuvassa bakteeridiagnostiikassa käyttökelpoisia

välineitä ja menetelmiä, jotka ovat herkkiä, tehokkaita ja lajispesifisiä ja joiden avulla voidaan tunnistaa vain halutut bakteerit spesifisesti. Keksinnön tarkoituksena on myös antaa käyttöön menetelmiä, joilla infektion aiheuttava bakteeri voidaan diagnosoida oleellisesti aiempaa nopeammin; jolloin potilaalle voidaan määrätä oikea ja tehokas antibioottihoito taudin varhaisemmassa vaiheessa, jolloin taudin kesto lyhenee ja mahdollisten haitallisten, jopa hengenvaarallisten komplikaatioiden riski vähenee.

Esillä oleva keksintö antaa käyttöön bakteerilajispesifisiä oligonukleotidikoettimia, jotka ovat peräisin DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavan geenialueen, *rpoB*:n (DNA directed RNA polymerase subunit B) konservoituneiden alueiden välisiltä ns. hypervarioivilta alueilta, joilla emäsjärjestys on hyvin erilainen eri bakteerilajeilla. Näiden bakteerilajispesifisten koettimien avulla infektioiden tavattujen bakteerien perimäainesta voidaan paitsi osoittaa myös samanaikaisesti tunnistaa.

Keksintö antaa käyttöön myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin infektiota aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneilta alueilta ja jotka monistavat tehokkaasti infektiota aiheuttavien bakteereiden DNA:ta myös kliinisistä näytteistä, jotka sisältävät runsaasti vierasta (ei-bakteeriperäistä) DNA:ta.

Lisäksi esillä oleva keksintö antaa käyttöön yksinkertaisia, nopeita, herkkiä ja spesifisiä menetelmiä, joilla olemassa olevan tekniikan mukaisten menetelmien haitat voidaan voittaa. Näillä menetelmillä kliinisesti merkittävistä bakteereista voidaan luotettavasti todeta ja diagnosoida kliinisistä näytteistä tai bakteeriviljelmistä.

Esillä oleva keksintö koskee oligonukleotidikoetinsekvenssejä, jotka hybridisoituvat normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektiota, erityisesti hengitystieinfektioita sekä korva-, nenä- ja kurkkutauteja, aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden konservoituneiden alueiden lähellä olevien hypervarioivien alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät jonkin sekvensseistä sekvenssitunnusnumerot 1 - 19 mukaisen sekvenssin ja/tai sen kanssa käänteisen ja/tai komplementaarisen sekvenssin tai näiden toiminnallisen fragmentin.

Tällaisia infektiota, erityisesti hengitystieinfektioita sekä korva-, nenä- ja kurkkutauteja, aiheuttavia bakteereja ovat esimerkiksi bakteerit *Hae*-

mophilus influenzae, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis* ja *Neisseria gonorrhoeae*.

5 Edullisesti oligonukleotidikoetinsekvenssin pituus on 15 - 30, edullisemmin 19 - 30 ja edullisimmin 19 - 26 nukleiinihappoa.

Esillä oleva keksintö koskee myös edellä mainittujen oligonukleotidikoetinsekvenssien käyttöä bakteerien toteamisessa, tunnistamisessa tai luokittelussa.

10 Esillä oleva keksintö koskee myös oligonukleotidikoetinseosta, joka sisältää minkä tahansa yhdistelmän, edullisesti kaikki, sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai näiden kanssa käänteisistä ja/tai komplementaarista sekvensseistä ja/tai näiden toiminnallisista fragmenteista. Eräässä edullisessa suoritusmuodossa haluttu koetinseos on kiinnitetty kiinte-
15 älle kantajalle. Edullisesti kiinteälle kantajalle on kiinnitetty oligonukleotidikoetinseos, joka sisältää kaikki sekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai näiden kanssa käänteiset ja/tai komplementaariset sekvenssit.

Esillä oleva keksintö koskee myös uutta DNA-alukeseosta, joka sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät sekvenssien tunnusnumerot 20 ja 21 mukaiset sekvenssit ja/tai niiden kanssa komplementaariset sekvenssit tai näiden toiminnalliset fragmentit .
20

Esillä oleva keksintö koskee myös mainitun alukeseoksen käyttöä *rpoB*:n monistamisessa.
25

Esillä oleva keksintö koskee lisäksi diagnostista menetelmää infektioita aiheuttavan bakteerin osoittamiseksi ja tunnistamiseksi kliinisestä näytteestä, jolloin menetelmässä

a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan käyttäen DNA-alukeseosta, joka sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat infektioita aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät sekvenssien tunnusnumerot 20 ja 21 mukaiset sekvenssit ja/tai niiden kanssa komplementaariset sekvenssit tai näiden toiminnalliset fragmentit,
30
35

b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen halutun yhdistelmän kanssa oligonukleotidikoetinsekvenssejä, jotka hybridisoituvat normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektiota aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevan hypervarioivan alueen sekvenssin kanssa ja jotka ovat bakteerilajispesifisiä, hybridisaatio-olosuhteissa, ja

c) todetaan mahdollinen hybridisaatiokompleksin muodostuminen.

Edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan polymeraasiketjureaktiota käyttäen ja monistettu DNA saatetaan kosketukseen kiinteälle kantajalle kiinnitettyjen bakteerilajispesifisten oligonukleotidikoettimien kanssa.

Eräässä edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa kliinisestä näytteestä eristetyn DNA:n monistuksessa käytetään sopivasti leimattua nukleotidiä todettavissa olevan kohdejuosteen aikaansaamiseksi.

Toisessa edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteän kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty kaikki keksinnön mukaiset lajispesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai niiden käänteiset ja/tai komplementaariset sekvenssit.

Vielä eräässä edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteän kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty keksinnön mukaiset, tietylle tai muutamalle hengitystieinfektioita aiheuttavalle bakteerille spesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on vastaavat sekvenssitunnusnumerot taulukosta 3 eli sekvenssit 1 ja 2, 3 ja 4, 5 ja 6, 7 ja 8, 9 ja 10, 11 ja 12, 13 ja 14, 15 ja 16, 17 ja 18 tai sekvenssi 19, ja/tai niiden komplementaariset sekvenssit ja/tai näiden käänteiset sekvenssit.

30 Kuvioiden lyhyt selostus

Kuvio 1 esittää esimerkin (*Mycoplasma pneumoniae*) hypervarioivasta *rpoB*-geenialueesta, joka rajoittuu konservoituneisiin alueisiin. Konservoidut alueet on lihavoitu ja alleviivattu ja ne toimivat *rpoB*-alukkeiden kiinnittymiskohtina. Niiden väliin jää hypervarioiva alue, joka on merkitty pienillä kirjaimilla.

Kuviossa 2 esitetään agarosigeelielektroforeesitarkistus puhdasviljeltyjen bakteerien DNA:n leimaus-PCR:n tuloksesta. Kuviossa kaista 1 on *M. catarrhalis*, kaista 2 on *M. cuniculi*, kaista 3 on *M. caviae*, kaista 4 on *N. gonorrhoeae*, kaista 5 on *H. influenzae*, kaista 6 on *H. ducreyi*, kaista 7 on *H. parainfluenzae*, kaista 8 on *S. pyogenes*, kaista 9 on *S. pneumoniae*, kaista 10 *S. oralis*, kaista 11 on *S. mitis*, kaista 12 on *P. aeruginosa*, kaista 13 on *C. diphteriae*, kaista 14 on *L. pneumophila*, kaista 15 on *E. coli*, kaista 16 on *P. pneumotropica*, kaista 17 on *S. aureus*, kaista 18 on *M. pneumoniae* ja M on 100 emäsparin markkeri.

Kuviossa 3 esitetään esimerkki hybridisaatiotuloksesta koetinlasilla. Hybridisoitavana kohdejuosteena oli *Streptococcus pneumoniae* (patogeeni) ja samaan sukuun kuuluva *Streptococcus oralis* (normaalifloora) puhdasviljelmästä eristetyt DNA:n *rpoB*-monistuma (epäsymmetrinen Cy-5-dCTP-leimattu PCR-tuote). Esimerkkilasilla on nuolilla merkityt *S. pneumoniae* leimattua kohdejuostetta sitovat oligospotit. Niissä olevien oligonukleotidien sekvenssit ovat taulukossa 3 esitetyt *S. pneumoniae* oligonukleotidikoettimet 5 ja 6. Signaalin antoi myös positiivinen kontrollioligonukleotidi (universaali PCR-alue sekvenssinumero 21). *S. oralis* -spesifisiä oligonukleotidispotteja lasilla ei ole.

20 Keksinnön yksityiskohtainen selostus

Esillä oleva keksintö perustuu tutkimuksiin, joissa pyrittiin löytämään spesifisempiä vaihtoehtoja ribosomaalisen RNA:n käytölle infektioita aiheuttavien bakteerien diagnostiikassa. Tutkimus kohdistettiin muihin geeneihin, jotka ovat elintärkeitä bakteereille. *rpoB*-geenialue koodaa kolmesta alayksiköstä α , β ja β' (vastaavasti *rpoA*, *rpoB* ja *rpoC*) koostuvan DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä β (*rpoB*). DNA-ohjatun RNA-polymeraasin tehtävä bakteereissa on DNA:n transkriptio.

Tietyt alueet proteiineista ja vastaavasti myös geeneistä ovat säilyneet evoluution aikana lähes muuttumattomina eli konservoituneet. Tässä yhteydessä termillä "konservoitunut alue" tai "konservoituneet alueet" tarkoitetaan *rpoB*-geenin tai -proteiinin aluetta tai alueita, joiden emäsjärjestys tai vastaavasti aminohappojärjestys on säilynyt lähes muuttumattomana eri infektioita aiheuttavien bakteerilajien välillä. Yleensä nämä konservoituneet alueet ovat proteiinin toiminnan kannalta kaikkein tärkeimpiä alueita. *rpoB*-molekyylit eivät kuitenkaan ole yhtä konservoituneita kuin ribosomaaliset RNA-molekyylit. Koska kyseessä ovat proteiinimolekyylit, niitä koodaavissa geeneissä on ge-

neettisen koodin luonteesta johtuen enemmän eroja nukleiinihappotasolla kuin mitä rakenteellisia RNA-molekyylejä (esim. 16S rRNA -molekyylit) koodaavissa geeneissä. *rpoB*-molekyylit eivät myöskään kokonaisuudessaan ole evoluution kuluessa säilyneet yhtä muuttumattomina kuin rakenteelliset RNA-molekyylit:

5 *rpoB*-molekyyleistä on löydettävissä myös lyhyitä jaksoja, joissa erot eri bakteerilajien välillä ovat niin suuria (myös lähisukuisten välillä), että kyseisiä jaksoja voidaan pitää lajispesifisinä. Tässä yhteydessä ilmaisu hypervarioiva alue viittaakin *rpoB*-geenien DNA-sekvensseihin, jotka eroavat nukleotidiemäse-

10 sijaitsevat lähellä *rpoB*-geenien konservoituneita sekvenssejä ja ovat mahdollisesti konservoituneiden sekvenssien rajaamia tai ympäröimiä.

Edellä mainittuja ominaisuuksia käytettiin hyväksi bakteerilajeille spesifisten koettimien suunnittelemisessa. Lajispesifisten koettimien (eli oligonukleotidien) (taulukko 3) suunnittelussa käytettiin linjaukseen perustuvaa

15 suunnittelustrategiaa. Suunnittelun kohteena olleiden bakteerien *rpoB*-geenit linjattiin referenssibakteereista lähtöisin olevien vastaavien geenien kanssa. Sekvenssit saatiin EMBL:n sekvenssitietokannasta tai tuotettiin itse kloonamalla niistä bakteerilajeista, joista *rpoB*-sekvenssiä ei ollut saatavilla julkisista sekvenssitietokannoista. Sekvenssit tuotettiin monistamalla bakteeripuhdasvil-

20 jelmistä haluttu *rpoB*-sekvenssijakso, joka sitten kloonattiin ja sekvensoitiin. Esimerkki *Mycoplasma pneumoniae* -bakteerin hypervarioivasta *rpoB*-geenialueesta, joka rajoittuu konservatiivisiin alueisiin, on esitetty kuviossa 1. Konservoituneet alueet on lihavoitu ja alleviivattu ja ne toimivat universaalien *rpoB*-alukkeiden kiinnittymiskohtina. Näiden väliin jää hypervarioiva alue, jolle

25 lajispesifiset koettimet on suunniteltu (pienemmät isot kirjaimet).

Sekvenssien linjauksessa käytettiin BioEdit-ohjelmaa ja ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta laskettiin konsensussekvenssi ja sopivasti konservoituneet alueet etsittiin manuaalisesti. Nämä alueet tarkoittavat sekvenssijaksoja, jotka ovat konservoituneet suunnittelun kohteena olevien bakteerien

30 geeneissä, mutta joita ei löydy ainakaan kokonaan referenssibakteerien geeneistä. Näistä jaksoista valittiin sopivan pituiset (esim. 19 - 26 emästä) sekvenssijaksot varsinaisten oligonukleotidien sekvensseiksi. Valittuja oligonukleotidisekvenssejä verrattiin EMBL:n prokaryoottitietokantaan FASTA-algoritmiä käyttävällä ohjelmalla. Ne oligonukleotidisekvenssit, jotka erosivat

35 muiden kuin suunnittelun kohteena olevien bakteerien *rpoB*-geeneistä vähintään kahden emäksen verran, valittiin jatkotutkimuksiin. Oligonukleotideille

määritettiin teoreettinen sulamislämpötila (T_m) ja tutkittiin, muodostavatko oligonukleotidit sekundaarirakenteita (hiusneularakenteita). Ne oligonukleotidit, jotka eivät muodostaneet voimakkaita sekundaarirakenteita ja joiden T_m -lämpötila oli vähintään 45 °C, valittiin kokeellisiin spesifisyystutkimuksiin. Laboratoriossa koettimien spesifisyys testattiin ensin useilla eri bakteerilajeista eristetyillä DNA-näytteillä (taulukko 2) sekä lisäksi potilasnäytteillä (taulukko 4).

Esillä olevan keksinnön mukaiset oligonukleotidikoettimet käsittävät sekvenssien tunnusnumerot 1 – 19 mukaiset sekvenssit ja/tai niiden kanssa käänteiset ja/tai komplementaariset sekvenssit ja/tai näiden käänteiset sekvenssit. Ne voivat olla eripituisia, ja niiden sopivan pituuden määrää vain haluttu laji-spesifisyys ja toimivuus hybridisaatioreaktiossa. Tavallisesti ne ovat 15 – 30, edullisesti 19 – 30 ja edullisimmin 19 – 26, nukleotidia pitkiä. Koettimet voivat myös olla eri tavoin modifioituja (ne voivat esimerkiksi sisältää modifioituja nukleotidejä, kuten inosiini), niihin voi olla liitettynä erilaisia kemiallisia yhdisteitä tai ryhmiä (esim. aminoryhmiä) tai muita molekyyliä, kuten erilaisia detekti-oon tarvittavia leimoja, tai niistä voi kokonaan puuttua modifikaatiot. Edullisten keksinnön mukaisten bakteerilajispesifisten koettimien sekvenssit on esitetty taulukossa 3 ja niillä on sekvenssitunnusnumerot 1 – 19. Luonnollisesti näiden oligonukleotidisekvenssien käänteiset ja komplementaariset sekvenssit ovat yhtä käyttökelpoisia ja edullisia, kuten alan ammattimiehelle on ilmeistä. Samoin mainittujen oligonukleotidisekvenssien toiminnalliset fragmentit ovat käyttökelpoisia koettimina edellyttäen, että lajispesifisyys säilyy.

PCR-alukkeiden suunnittelua varten *Chamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ja *Streptococcus pyogenes*in *rpoB*-proteiinien aminohapposekvenssit linjattiin BioEdit-ohjelmalla käyttäen ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta löytyi konservoituneita alueita, jotka otettiin universaalien alukkeiden suunnittelun lähtökohdaksi. Konservoituneet aminohappojaksot käännettiin takaisin nukleiinihapposekvenssiksi. Geneettisen koodin luonteesta johtuen alukkeisiin tuli useita degeneroituneita kohtia. Konservoituneiden jaksojen perusteella valmistettiin alukepareja, joita testattiin laboratoriossa (spesifisyys- ja herkkyystestaukset).

Tutkimuksen tavoitteena oli alukepari, joka toimii kliinisistä näytteistä, mutta samalla säilyttää riittävän laajan spesifisyyden eli sen avulla voidaan monistaa kaikkien hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien *rpoB*-geenit. Toimiva alukepari on esitetty taulukossa 1. Tämän alukeparin avulla kaikkien

fylogeneettisesti hyvinkin etäällä toisistaan olevien bakteerien (taulukko 2) *rpoB*-geenit voidaan monistaa myös tilanteessa, jossa näytteessä on runsaasti ihmisen DNA:ta.

Taulukko 1. *rpoB*-universaalialukkeet

5

Alukkeen nimi	Sekvenssi 5'→3'	Sekvenssin tunnusnumero
<i>rpoB2-for</i>	GCYGGNCGHCAYGGWAAYAARGG	20
<i>RPOb2-rew</i>	GGYACSCCVAGDGGGTTYA	21

Alukesekvensseissä

D tarkoittaa emästä A tai G tai T,

Y tarkoittaa emästä C tai T,

10 N tarkoittaa emästä A tai G tai C tai T,

H tarkoittaa emästä A tai C tai T,

W tarkoittaa emästä A tai T,

R tarkoittaa emästä A tai G,

S tarkoittaa emästä C tai G ja

15 V tarkoittaa emästä A tai C tai G.

Kyseessä ovat siis alukeseokset, jotka koostuvat useista eri alukevaihtoehtoista. Esim. alukkeen *rpoB2-for* tapauksessa seoksessa on siis alukeita, joissa W:n kohdalla on A (adeniini) ja alukeita, joissa W:n kohdalla on T (tyymiini).

20 Keksinnön mukaisesti spesifisiä koettimia voidaan käyttää infektiota, erityisesti hengitystieinfektioita sekä korva-, nenä- ja kurkkutauteja aiheuttavien bakteerien tunnistamiseksi missä tahansa sopivassa menetelmässä, jolla hybridisaatio voidaan osoittaa. Tällaiset menetelmät ovat alan ammattilaisten hyvin tuntemia ja ne voidaan toteuttaa sekä liuoksessa että DNA:ta sitovalla kiinteällä kantajalla, kuten nitroselluloosa- tai nylonkalvolla, tai lasilla.

25 Edullisessa keksinnön mukaisessa menetelmässä toteaminen tehdään käyttäen DNA-sirutekniikkaa, jolloin DNA-sirulla tai DNA-lastulla (chip) tarkoitetaan pienikokoista alustaa, jolle tunnettuja nukleiinihappojaksoja on kiinnitetty tiettyyn ennalta määrättyyn järjestykseen. Jos sirulle kiinnitetyt nukleiinihappojaksot ovat lyhyempiä kuin 100 emäsparia (yleensä noin 20 - 30 emäsparia), puhutaan ns. oligonukleotidisiruista.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä analysoitava näyte voi olla bakteeriviljelmä, kudospala, eritenäyte, kuten yskös- tai sivelynäyte, verinäyte tai muu sopiva näyte, erityisesti eritenäyte kliinisissä diagnostisissa sovelluksissa.

- 5 Analysoitavasta näytteestä eristetään DNA millä tahansa tunnetulla menetelmällä, kuten kaupallisesti saatavilla olevilla DNA:n eristyskitteillä (esim. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche; NucleoSpin, BD Biosciences Clontech; tai QIAamp DNA Mini-kit, Qiagen) tai perinteisillä fenoli-kloroformi tai vastaavilla orgaanisilla liuottimilla tehtävillä uutoilla, joko manuaalisesti tai erityisillä DNA:n eristykseen soveltuvilla laitteilla. Edullisesti käytetään helpon
10 saatavuuden, nopeuden ja toistettavuuden vuoksi kaupallisia kittejä.

- Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä DNA:n monistukseen käytettävät reagenssit voivat olla mitä tahansa alalla DNA:n monistukseen käytettyjä reagensseja, jotka alan ammattimiehet hyvin tuntevat. Sopivia
15 ja edullisia kaupallisesti saatavissa olevia reagensseja ovat erityyppiset Taq-DNA-polymeraasit ja niiden puskurit (esim. AmpliTaqGOLD, AmpliTaqLD, DyNAzyme, TaqPlus Precision ja HotStarTaq), nukleotidit tai valmiit nukleotidiseokset (esim. Sigma, Applied Biosystems, Amersham Biosystems), $MgCl_2$ (jolloin yleensä käytetään saman valmistajan tuotetta kuin Taq-DNA-polymeraasi), Cy5-dCTP (esim. NEN LifeSciences, Amersham Biosciences).
20

- Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä kloonaus voidaan suorittaa millä tahansa tunnetulla menetelmällä, kuten kaupallisesti saatavilla olevilla kloonauskitillä (esim. Qiagen PCR Cloning Kit, QIAGEN tai TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Kloonaustuotteen sekvensointi voidaan suorittaa millä tahansa tähän tarkoitukseen soveltuvalla sekvensaattorilla (esim.
25 Applied Biosystems, mallit 373A, 377 tai 3100 tai Bio-Rad Sequi-Gen GT) tai manuaalisella sekvensoinnilla. Sekvenssitulokset voidaan analysoida manuaalisesti tai tähän tarkoitukseen kehitetyillä sekvenssianalyysiohjelmilla (Applied Biosystems Sequencer tai InforMax:n Vector NTI Suite Version 7).

- 30 Monistukseen käytettävä laitteisto voi niin ikään olla mikä tahansa sopiva laitteisto (esim. T1 Thermocycler, Biometra tai GenAmp PCR system 2700, Applied Biosystems). Käytännössä kaikki DNA-monistukseen sopivat laitteet ja laitteistot sopivat tarkoitukseen ja monistus voidaan myös suorittaa manuaalisesti siirtämällä reaktioputkia lämpötilasta toiseen. Monistus voidaan
35 myös tehdä suoraan DNA-sirulla.

Monistustuotteen puhdistus voidaan suorittaa millä tahansa kaupallisella menetelmällä (esim. High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, MicroSpin S-400 tai S-300 HR Columns, Amersham Biosciences tai QIAquick PCR-purification-Kit, Qiagen) tai se voidaan tehdä orgaanisella liuottimella tapahtuvalla uutolla. Monistustuotetta voidaan käyttää hybridisaatioreaktioon myös sellaisenaan ilman puhdistusta tai uuttoa.

Yksijuosteisen kohdejuosteiden aikaansaamiseksi voidaan käyttää mitä tahansa tunnettua menetelmää. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi epäsymmetrinen PCR, eksonukleaasimenetelmää tai yksijuosteisen kohdejuosteiden syntetisointi suoraan sirulla (esim. matriXarray, Roche Applied Science). Keksintö käsittää myös sovellukset, joissa hybridisaatioreaktioon voidaan käyttää kaksijuosteista monistustuotetta. Tässä edullinen menetelmä yksijuosteisen kohdejuosteiden aikaansaamiseksi on epäsymmetrinen PCR.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan leimattujen kohdejuosteiden aikaansaamiseksi käyttää mitä tahansa sopivaa leimaa. Sopivia leimoja ovat fluorerenssileimat (esim. Cy5, Cy3, Cy2, TexasRed, FITC, Alexa 488, TMR, FluorX, ROX, TET, HEX), radioaktiiviset leimat (esim. ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S) ja kemiluminesoivat leimat (esim. HiLight Single-Color Kit). Tässä keksinnössä Cy5-dCTP-fluoresenssileima (Amersham Biosciences) on edullinen. Keksintö käsittää myös sovellukset, joissa leimaa ei tarvita lainkaan, kuten sellaiset, joissa toteaminen perustuu sähköiseen impulssiin (esim. Motorola eSensor).

Kun hybridisaatio tapahtuu kiinteällä kantajalla, hybridisaatiossa käytettävät koettimet voidaan kiinnittää alustaansa kovalenttisen tai epäkovalenttisen sidoksen avulla tai kiinnittämisessä voidaan käyttää muuta olemassa olevaa kemiallista, sähkökemiallista tai vastaavaa menetelmää. Alusta, jolle koettimet kiinnitetään voi olla valmistettu lasista, muovista, metallista, nailonista, nitroselluloosasta, polyakryyliamidista, silikonista tai näiden yhdistelmistä, ja sen koko voi vaihdella muutamasta millimetristä kymmeneen senttimetriin. Käytettävän alustan pintakäsittely voi olla aminosilaani- tai mikä tahansa muu soveltuva pintakäsittely, kuten esimerkiksi epoksisilaanipintakäsittely, tai voidaan käyttää sellaista alustaa, joka ei vaadi erillistä pintakäsittelyä. Tässä edullinen alusta koettimille on aminosilaanilla käsitelty mikroskooppilasi (Genorama, Asper Biotech Ltd., Eesti).

Koettimet voidaan printata käytettävälle alustalle millä tahansa kaupallisesti saatavilla olevalla ja tähän tarkoitukseen soveltuvalla laitteistolla

(esim. Qarray-mini arraying system, Lucidea Array Spotter tai OmniGrid, GeneMachines arrayer) tai ne voidaan pipetoida alustalle manuaalisesti. Koettimet voidaan myöskin syntetisoida suoraan alustalle esimerkiksi fotolitografiaa käyttämällä.

5 Hybridisaatiossa käytetty hybridisaatioseos voi olla koostumukseltaan erilainen kuin mitä jäljempänä suoritusesimerkeissä on esitetty, mm. suolan koostumus ja/tai suolapitoisuus voivat vaihdella (esim. 2-4xSSC tai SSPE) tai hybridisaatiossa voidaan käyttää kaupallisesti saatavilla olevia hybridisaatioliuoksia (esim. ArrayHyb, Sigma). Hybridisaatioseoksessa voidaan myöskin
10 käyttää denaturoivia tai stabiloivia lisäaineita (esim. formamidi tai DMSO, dimetyylisulfoksidi) tai aineita, jotka vähentävät epäspesifistä sitoutumista (esim. BSA eli naudan seerumin albumiini tai ssDNA eli lohen maidin DNA). Hybridisaatio voidaan tehdä eri hybridisaatiolämpötilassa (yleensä välillä 40 - 70 °C) ja hybridisaatioon käytettävä aika voi vaihdella riippuen sovelluksesta muutamasta minuutista vuorokauteen. Hybridisaatio voidaan vesihauteen sijaan tehdä
15 esim. lämpökaapissa tai erityisessä hybridisaatiolaitteessa (esim. GeneTAC HybStation tai Lucidea Slidepro Hybridizer). Hybridisaation jälkeiset pesut voivat myöskin kestoltaan, määrältään, lämpötilaltaan ja käytettävän pesuliuoksen koostumukseltaan olla erilaiset kuin mitä tässä on esitetty. Lasien pesu voidaan
20 myös suorittaa erillisellä laitteella. Joissakin tapauksissa hybridisaation jälkeinen lasin tai sirun pesu ei ole välttämätön, vaan siru voidaan analysoida heti hybridisaation jälkeen. Tässä edullinen hybridisaatio-olosuhde on +57 °C:n vesihaude, jossa laseja hybridisoidaan 14 - 16 tuntia.

Koetinlasit tai -sirut voidaan analysoida millä tahansa tähän tarkoitukseen soveltuvalla laitteistolla tai lukijalla (esim. GeneTAC UC4, GenePix
25 Personal 4100A tai Agilent DNA Microarray Scanner) Jos kohdejuoste on leimattu fluoresoivalla leimalla, voidaan analysointiin käyttää myös esim. fluoresenssimikroskooppia. Jos leimana on käytetty radioaktiivista leimaa, voidaan siru tai kalvo analysoida autoradiografialla. Jos hybridisaatio on tehty elektronisella sirulle ja toteaminen perustuu esim. sähköiseen impulssiin, analysoidaan
30 ne tätä tarkoitusta varten suunnitellulla laitteistolla.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä ei kärsi tunnetun tekniikan ongelmista. Menetelmän monistusvaihe on hyvin herkkä ja universaalit alukkeet monistivat tehokkaasti tietyn geenialueen, *rpoB*:n fylogenetisesti erilaisista bakteerilajeista riippumatta siitä, oliko kyseessä gramnegatiivisen vai
35

grampositiivisen soluseinän omaava bakteerilaji (taulukko 2). Lisäksi monistus-
tuote on lyhyt (114 emäsparia), mikä edesauttaa monistusreaktion tehokkuutta.

Bakteerilajispesifiset koettimet on suunniteltu *rpoB*-geenialueelle,
joka on huomattavasti varioivampi geenialue kuin esim. 16S rRNA -alue, jota
5 on aiemmin käytetty bakteeridiagnostiikassa. Vaikka menetelmässä käytetyt
universaalit alukkeet monistavatkin tehokkaasti myös normaaliflooran baktee-
reita, tämä ei aiheuta vääriä positiivisia, sillä keksinnön mukaiset koettimet
ovat hyvin lajispesifisiä ja tunnistavat vain ne bakteerit, joita varten ne on
suunniteltu. Hybridisoitaessa lasille esim. *Streptococcus pneumoniae* -puhdas-
10 viljelmästä monistettua kohdejuostetta, hybridisoituu se ainoastaan *Strepto-*
coccus pneumoniae -spesifisten koettimien ja positiivisen kontrollikoettimen
kanssa. Toisaalta hybridisoitaessa lasille vain normaaliflooran bakteerista,
esim. *Streptococcus oralis*, monistettua kohdejuostetta, se ei sitoudu yhteen-
kään patogeenikoettimeen, vaan ainoastaan positiiviseen kontrollikoettimeen
15 (kuvio 3). Kaikki esillä olevan keksinnön mukaiset spesifiset oliginukleotidikoet-
timet testattiin ristiin eri bakteerilajien ja myös useiden normaaliflooraan kuulu-
vien lajien kanssa, eikä ristireaktioita tapahdu. Siten esillä olevan keksinnön
mukainen menetelmä on selvästi herkempi ja spesifisempi kuin aiemmin kuva-
tut vastaavantyyppiset menetelmät.

20 Seuraavaksi keksintöä valaistaan tarkemmin esimerkkien avulla.
Menetelmää kuvattaessa on viitattu erilaisiin, tässä sovelluksessa käytettyihin
laitteistoihin, materiaaleihin, lämpötiloihin, kemikaaleihin tai vastaaviin. Nämä
voivat luonnollisesti vaihdella keksinnön eri sovelluksissa tarkoituksenmukai-
sella tavalla, eivätkä keksintö ja sen suoritusmuodot siten rajoitu alla kuvattui-
25 hin esimerkkeihin.

Esimerkki 1. Keksinnön mukaisten PCR-alukkeiden suunnittelu

PCR-alukkeiden suunnittelua varten *Chlamydia pneumoniae*, *My-*
coplasma pneumoniae, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneu-*
moniae ja *Streptococcus pyogenes*in *rpoB*-proteiinien aminohappose-
30 kvenssit linjattiin BioEdit-ohjelmalla käyttäen ClustalW-linjausalgoritmia.

Linjauksesta löytyi konservoituneita alueita. Nämä konservoituneet
aminohappojaksot otettiin universaalien alukkeiden suunnittelun lähtökohdaksi.
Ensin ne käännettiin takaisin nukleinihapposekvenssiksi, jolloin niihin tuli ge-
neettisen koodin luonteesta johtuen useita degeneroituneita kohtia. Sitten kon-
35 servoitujen jaksojen perusteella syntetisoitiin (alukkeet syntetisoi Sigma-
Genosys, Englanti, josta alukkeet tilattiin tilauspalvelun kautta www.sigma-

genosys.co.uk) alukkeet, joita testattiin spesifisyyden ja herkkyuden suhteen. Spesifisyys testattiin monistamalla taulukossa 2 esitetyistä eri bakteerilajeista eristettyä DNA jäljempänä olevassa esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Alukkeet, jotka monistivat kaikkien tutkittujen bakteerien *rpoB*-DNA-aluetta, valittiin uni-

5 versaaleiksi PCR-monistusalueiksi eli alukkeet *rpoB2*-for, jonka sekvenssi on GCYGGNCGHCAYGGWAAYAARGG (sekvenssitunnusnumero 20), ja *RPOb2*-rew, jonka sekvenssi on GGYACSCCVAGDGGGTTYA (sekvenssitun-

10 nusnumero 21), jolloin D tarkoittaa emästä A tai G tai T, Y tarkoittaa emästä C tai T, N tarkoittaa emästä A tai G tai C tai T, H tarkoittaa emästä A tai C tai T, W tarkoittaa emästä A tai T, R tarkoittaa emästä A tai G, S tarkoittaa emästä C tai G ja V tarkoittaa emästä A tai C tai G (vrt taulukko 1).

Tämä alukeseos tunnisti *rpoB*-geenin konservoituneet alueet kaikista taulukossa 2 luetteluista bakteereista ja se toimii myös kliinisillä näytteillä (katso esimerkki 6). Erityisesti tämän alukeparin avulla fylogeneettisesti hyvin-

15 kin etäällä toisistaan olevien bakteerien (taulukko 2) *rpoB*-geenit voidaan monistaa myös tilanteessa, jossa näytteessä on runsaasti ihmisen DNA:ta.

Taulukko 2. Bakteerikannat, joita käytettiin rpoB-PCR-alukkeiden ja -oligonukleotidikoettimien testauksessa

Bakteerilaji	Toimittajan koodi (näytteen tyyppi)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM 9143 (bakt. kanta)
<i>Moraxella cuniculi</i>	ATCC VR 1355 (bakt. kanta)
<i>Moraxella caviae</i>	ATCC 14659 (bakt. kanta)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 53420D (DNA)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 51907D (DNA)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	DSM 8925 (bakt. kanta)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	DSM 8978 (bakt. kanta)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM 20565 (bakt. kanta)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 20566 (bakt. kanta)
<i>Streptococcus oralis</i>	DSM 20627 (bakt. kanta)
<i>Streptococcus mitis</i>	DSM 12643 (bakt. kanta)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	DSM 20698 (bakt. kanta)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071 (bakt. kanta)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	DSM 44123 (bakt. kanta)
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152D (DNA)
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 (bakt. kanta)
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	ATCC 13669 (bakt. kanta)
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231 (bakt. kanta)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 51907D (DNA)

ATCC = American Type Culture Collection

5 DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Esimerkki 2. Keksinnön mukaisten oligonukleotidikoettimien suunnittelussa tarvittavien uusien sekvenssien tuottaminen kloonaamalla

10 Bakteerien *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella cuniculi*, *Moraxella caviae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophila* ja *Pasteurella pneumotropica* rpoB-sekvenssit sekvenssoitiin seuraavassa esitetyn yleisen menetelmän mukaisesti käytettäviksi keksinnön mukaisten oligonukleotidikoettimien suunnittelussa.

Bakteeripuhdasviljelmistä eristetään ensin DNA käyttäen QIAamp DNA Mini -kittiä (Qiagen, Saksa). Kun DNA on eristetty, halutulta DNA-alueelta monistetaan kloonaukseen käytettävä kohdejuoste symmetristä (tavallista) polymeerasiketjureaktiota (PCR) käyttäen. Monistuksen ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan reaktioseos sekoittamalla näytteestä eristetty DNA esimerkiksi 1 valmistettujen universaalien bakteerialukkeiden ja muiden monistukseen tarvittavien komponenttien kanssa.

Tällöin kloonauksen PCR:ssä 25 µl:n reaktioseos sisältää 20 pmol rpoB2-for-alukeseosta, 20 pmol rpoB2-rev-alukeseosta, 200 µM kutakin dATP, dGTP, dTTP ja dCTP (Sigma, USA), 1 x HotStarTaq PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), johon lisätty MgCl₂:a siten, että lopullinen konsentraatio on 2,8 mM, 1,25 U HotStarTaq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa) ja 2,5 µl eristettyä DNA:ta.

Kloonauksen PCR-reaktio tehdään GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems) käyttäen seuraavanlaista lämpöohjelmaa: alkudenaturaatio/polymeraasin aktivaatio 15 min lämpötilassa 95 °C, sen jälkeen kaikkiaan 38 sykliä 35 s lämpötilassa 94 °C, 40 s lämpötilassa 54 °C, 35 s lämpötilassa 72 °C sekä loppupidennys 7 min lämpötilassa 72 °C. Kun PCR-reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen tarkastetaan geielektroforeesilla 2-%:isessa agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia.

Itse kloonauksen tehdään välittömästi PCR-reaktion jälkeen TOPO TA Cloning Kit -kitillä (Invitrogen). Kloonauksen reaktioseos sisältää 4 µl PCR-tuotetta, 1 µl suolaseosta (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) ja 1 µl TOPO-vektoria (pCR 4-TOPO), jotka sekoitetaan keskenään eppendorffputkessa. Seosta inkuboidaan 5 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen seosputki siirretään jäille. Tämän jälkeen tehdään kemiallinen transformaatio, jossa jäähtynyttä PCR-tuote-vektori-seosta lisätään 2 µl kompetenteille TOP10 *E. coli* -soluille (50 µl soluja). Tämän jälkeen soluja inkuboidaan jäillä 10 min. Seuraavaksi tehdään lämpösokkikäsittely, jossa soluputki siirretään +42 °C:een 30 sekunnin ajaksi. Sitten putki siirretään jäille ja siihen lisätään 250 µl huoneenlämpöistä SOC-liuosta (2 % tryptoni, 0,5 % hiivauute, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoosi). Tämän jälkeen putkea ravistellaan vaakasuunnassa (200 rpm) +37 °C:ssa 1 tunti. Seuraavaksi 20 µl seosta maljataan LB-bakteerimaljalle (Luria-Bertani, 10 % tryptonia, 0,5 % hiivauutetta, 1,0 % NaCl, 1,5 % L-agar:ia laimennettuna veteen, pH 7), joka sisältää 50 g/ml ampicilliiniä.

Maljoja kasvatetaan +37 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä maljalta valitaan kymmenen pesäkettä, joista tehdään sekvensointi-PCR.

Sekvensointi-PCR:ssä 50 µl:n reaktioseos sisältää 0,4 pmol M13-reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') ja M13-forward (5'-GTAAACGACGGCCAG) -alukkeita (sisältyvät kittiin), 150 µM kutakin dATP, dGTP, dTTP ja dCTP (Sigma, Yhdysvallat), 1 x HotStarTaq PCR -puskuri (Qiagen, Saksa), 1,25 U HotStarTaq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa). Monistusta varten pieni osa bakteeripesäkkeestä siirretään näytetikulla PCR-seosputkeen.

Sekvensointi-PCR-reaktio tehdään GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems) käyttäen seuraavanlaista lämpöohjelmaa: 15 min alkudenaturaatio lämpötilassa 95 °C ja 30 sykliä käsittäen 1 min lämpötilassa 94 °C, 1 min lämpötilassa 55 °C, 1 min lämpötilassa 72 °C sekä 10 min loppupidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR-reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen tarkastetaan geelielektroforeesilla 2-%:isessa agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia. Tämän jälkeen PCR-tuote puhdistetaan poistamalla reaktioseoksesta ylimääräiset alukkeet, nukleotidit, puskuuri ja polymeraasientsyymi QIAquick PCR -puhdistuskitillä (Qiagen, Saksa).

Puhdistuksen jälkeen vektoriin insertoitunut fragmentti sekvensoidaan. Kaksitoista mikrolitraa sekvensointireaktioseosta sisältää 100 ng PCR-tuotetta ja 5 pmol joko M13-reverse- tai M13-forward-aluketta. Sekvensointi tehdään BigDye Terminator Version 3.0 -kitillä ja ABIPRISM 3100 -laitteistolla (Applied Biosystems, Yhdysvallat). Sekvenssit analysoidaan Vector NTI Suite Version 7-ohjelmistolla (InforMax).

Edellä kuvatulla yleisellä menetelmällä tuotettiin *rpoB*-sekvenssit seuraaville bakteerilajeille: *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella cuniculi*, *Moraxella caviae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophila* ja *Pasteurella pneumotropica* (sekvenssit tunnusnumerot 22 - 32).

Esimerkki 3. Lajispesifisten koettimien suunnittelu

Lajispesifisten oligonukleotidien eli koettimien suunnittelussa käytettiin linjaukseen perustuvaa suunnittelustrategiaa. Suunnittelun kohteena olleiden bakteerien *rpoB*-geenit linjattiin muutamasta referenssibakteerista (lähseitä sukua olevasta bakteerista) lähtöisin olevien vastaavien geenien kanssa. Esimerkiksi *Streptococcus pneumoniae* *rpoB*-geeni linjattiin bakteereiden

Streptococcus pyogenes, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus* ja *Fusobacterium necrophorum* *rpoB*-geenien kanssa. *S. oralis* ja *S. mitis* ovat *S. pneumoniae* lähistä sukua olevia bakteereja, eivätkä oligonukleotidit saa reagoida näiden normaaliflooraan kuuluvien bakteerien kanssa. Sekvenssit saatiin EMBL:n sekvenssitietokannasta tai ne tuotettiin kloonamalla esimerkissä 2 kuvatulla tavalla.

Sekvenssien linjauksessa käytettiin BioEdit -ohjelmaa ja ClustalW-linjauusalgoritmia. Linjauksesta laskettiin konsensussekvenssi ja sopivasti konservoituneet alueet etsittiin manuaalisesti. Nämä alueet tarkoittavat sekvenssijaksoja, jotka ovat konservoituneet suunnittelun kohteena olevien bakteerien geeneissä, mutta joita ei löydy ainakaan kokonaan referenssibakteerien geeneistä. Näistä jaksoista valittiin sopivanpituiset sekvenssijaksot varsinaisten oligonukleotidien sekvensseiksi (19 - 26 emästä). Valittuja oligonukleotidisekvenssejä verrattiin EMBL:n prokaryootitietokantaan FASTA-algoritmiä käyttävällä ohjelmalla. Ne oligonukleotidisekvenssit, jotka erosivat muiden kuin suunnittelun kohteena olevien bakteerien *rpoB*-geeneistä vähintään kahden emäksen verran, valittiin jatkotutkimuksiin. Oligonukleotideille määritettiin teoreettinen sulamislämpötila (T_m) ja tutkittiin, muodostavatko oligonukleotidit sekundaarirakenteita. T_m ($^{\circ}\text{C}$) laskettiin kaavalla

$$81,5 + 16,6 \log [\text{Na}] + 0,41(\% \text{GC}) - 0,61 (\% \text{for}) 500/N,$$
 jolloin $[\text{Na}]$ on monovalenttien kationien pitoisuus (laskuissa 50 M), %GC on guaniini- ja sytosiinimästen osuus prosentteina, %for on formamidipitoisuus (laskuissa 0 %) ja N on oligonukleotidin pituus. Sekundaarirakenteiden muodostumista tutkittiin Sigma-Genosysin tarjoamaa ohjelmaa käyttäen. Ohjelma voi käyttää www-selaimen avulla osoitteesta <http://www.sigma-genosys.co.uk/oligos/frameset.html> (calculators/basic calculator). Ne oligonukleotidit, jotka eivät muodostaneet voimakkaita sekundaarirakenteita ja joiden T_m -lämpötila oli vähintään 45°C , valittiin kokeellisiin spesifisyystutkimuksiin.

Oligonukleotidikoettimet syntetisoitiin ja samalla modifioitiin 5'-päästään (NH_2 -modifioidut oligot) (Sigma-Genosys, Englanti). Laboratoriossa koettimien spesifisyys testattiin useilla eri bakteerilajeista eristetyillä DNA-näytteillä (taulukko 2) sekä potilasnäytteillä (taulukko 4) esimerkeissä 4, 5 ja 6 kuvatuilla tavoilla. Testatuista koettimista valittiin ne, jotka toimivat parhaiten ja osoittautuivat kaikkein spesifisimmiksi. Bakteerilajispesifisten koettimien sekvenssit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. rpoB-oligonukleotidisekvenssit

Oligonukleotidin sekvenssinumero	Sekvenssi (5' - 3')	Tunnistettava bakteeri (rpoB- geeni)
1	GTTATCTCGAAAATTAACCCAGTTG	<i>Haemophilus influenzae</i>
2	CGATGAAAATGGTCAGCCAGTTGAA	<i>Haemophilus influenzae</i>
3	GTCGTTTCACGTATTGTACCAGT	<i>Streptococcus pyogenes</i>
4	TTCCAGACGGAACACCAGTTGAC	<i>Streptococcus pyogenes</i>
5	TTCCAGACGGAACCTCCAGTCGA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
6	CAGACGGAACCTCCAGTCGACAT	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
7	CAACGGCACCCCGGTGCGACAT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	TGGAAGACATGCCGCACGAT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	GCCTGTTGAGGATATGCCACA	<i>Legionella pneumophila</i>
10	TGGAAGATGGAACAGCAGTAGACA	<i>Legionella pneumophila</i>
11	TACGATGAAAACGGTACTCCG	<i>Escherichia coli</i>
12	CAACCCGATCGAAGATATGCC	<i>Escherichia coli</i>
13	TATGCCTTACTTACCAGATGGAC	<i>Staphylococcus aureus</i>
14	TACCAGATGGACGTCCGATC	<i>Staphylococcus aureus</i>
15	CAGTAGCGGACATGCCCCA	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
16	TTAGAAGATGGTACTCCAGTCGACA	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
17	ATGGCGGACGGCCGTCCTGTG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
18	AAATGGTAATCCTGTAGATATCGTAC	<i>Moraxella catarrhalis</i>
19	CTGCCTCAGGAAGATATGCCAT	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>

Esimerkki 4. Näyte-DNA:n monistus

5 Näyte-DNA:t bakteeriviljelmistä tai kliinisistä näytteistä monistettiin ja leimattiin seuraavassa esitettyä yleistä menetelmää käyttäen.

10 Analysoitavasta näytteestä (bakteeriviljelmä tai kliininen näyte) eristetään DNA käyttäen QIAamp DNA Mini-kittiä (Qiagen, Saksa). Kun DNA on eristetty, monistetaan halutulta DNA-alueelta hybridisaatioon käytettävä kohdejuoste epäsymmetristä polymeraasiketjureaktiota (PCR) käyttäen. Monistuksen ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan reaktioseos sekoittamalla näytteistä eristetty DNA, esimerkissä 1 valmistetut universaalit rpoB2-for- ja RPOB2-rew- alukeseokset sekä monistukseen tarvittavat muut komponentit keskenään.

PCR:ssä 25 μ l:n reaktioseos sisältää 32 pmol RPOb2-rew-alukeseosta, 8 pmol rpoB2-for-alukeseosta, 200 μ M kutakin dATP, dGTP ja dTTP sekä 140 μ M dCTP (Sigma, USA), 1 x HotStarTaq PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), johon lisätty $MgCl_2$:a siten, että lopullinen konsentraatio on 2,8 mM, 2,5 nmol Cy5-AP3-dCTP:tä (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 1,25 U HotStarTaq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa) ja 2,5 μ l eristettyä DNA:ta.

PCR-reaktio suoritetaan GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems, Yhdysvallat). PCR-laitteessa käytetty lämpöohjelma oli seuraavanlainen: 15 min alkudenturaatio/polymeraasin aktivaatio 10 lämpötilassa 95 °C ja 38 sykliä 35 s lämpötilassa 94 °C, 40 s lämpötilassa 54 °C, 35 s lämpötilassa 72 °C sekä 7 min loppupidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen tarkastetaan geielektroforeesilla 2-%:isessa agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia (kuvio 2). Tämän jälkeen Cy5-leimattu PCR-tuote puhdistetaan poistamalla reaktioseoksesta ylimääräiset alukkeet, nukleotidit, puskurit ja polymeraasientsyymi QIAquick-PCR-puhdistuskitillä (Qiagen, Saksa).

Esimerkki 5. Näytesirujen valmistus ja toiminta

Esimerkissä 3 valmistetut 5'-päästään aminoidut oligonukleotidikoettimet liuotettiin 400 mM natriumkarbonattipuskuriin (pH 9,0) siten, että lopulliseksi pitoisuudeksi tuli 50 μ M. Koettimet kiinnitettiin kovalenttisesti aminosilaanilla päällystetyille mikroskooppilaseille (Genorama, Asper Biotech Ltd., Eesti). Koettimien siirtäminen lasille tehtiin tätä tarkoitusta varten kehitetyllä robotilla (OmniGrid, GeneMachines, USA) ja neuloilla (Telechem SMP3, USA). Yhden printatun koetinalueen keskimääräinen koko oli 120 μ m. Laseille printattiin lisäksi positiivisiksi kontrolleiksi 5'-päästä aminoidut PCR-alukkeet. Printauksen jälkeen koetinlaseja pidettiin tunnin ajan ammoniakkihöyryssä koettimien kiinnittämiseksi lasille. Ammoniakkikäsittelyn jälkeen lasit huuhdeltiin kolmeen kertaan tislatussa vedessä ja niiden annettiin kuivua.

Seuraavaksi Cy5-leimattu kohdejuoste, joka oli valmistettu esimerkiksi 4 kuvatulla tavalla, hybridisoitiin mikroskooppilaseille, johon koettimet oli kiinnitetty. Hybridisaatioseos sisälsi n. 200 - 300 ng kohdejuostetta, 6 μ l 20 x SSC:ta (20xSSC sisältää 175,3 g NaCl:a ja 88,2 g natriumsitraattia, pH säädetään 7.0 HCl:lla; lopullinen konsentraatio 3,4x), 2 μ l 10-%:ista natriumdodekyyli-sulfaattia (SDS; lopullinen konsentraatio 0,3 %) ja steriiliä vettä siten, että hybridisaatioreaktioseoksen tilavuudeksi saatiin 37 μ l. Hybridisaatio aloitettiin denaturaatiolla lämpötilassa 95 °C 3 min. Tämän jälkeen putket jäähdytettiin

nopeasti jäillä. Kun seos oli jäähtynyt, se pipetoitiin koetinlasille ja peitettiin peitinlasilla. Koetinlasi asetettiin hybridisaatiokasetin (ArrayIt, TeleChem International, USA) sisälle ja kasetti suljettiin tiiviisti. Kasetti upotettiin vesihauteeseen, jonka lämpötila oli 57 °C ja lasia hybridisoitiin 14 -16 tuntia.

- 5 Hybridisaation jälkeen hybridisoimattomat tuotteet pestiin pois lasilta seuraavasti: 5 min lämpötilassa 57 °C 0,1-%:isella SDS:llä vedessä, 5 min huoneenlämmössä 0,1-%:isella SDS:llä 0,5 x SSC:ssä ja 5 min huoneenlämmössä 0,06 x SSC:llä.

- 10 Kun lasit olivat kuivuneet, ne analysoitiin lukijalaitteella (Agilent DNA Microarray Scanner, Agilent, USA). Jos Cy5-leimattu kohdejuoste oli sitoutunut yhteen tai useampaan lasilla olevaan koettimeen, näiden koetintäplien kohdalla nähtiin fluoresoiva signaali. Koska koetinlasit sisälsivät myös positiivisen kontrollin, saatiin hybridisaation toimivuuden varmistava fluoresoiva signaali, vaikka näyte ei olisikaan sisältänyt bakteeria.

- 15 Kuviossa 3 on esitetty esimerkki hybridisaatiosta. Hybridisoitavana kohdejuosteena oli *Streptococcus pneumoniae* (patogeeni) ja samaan sukuun kuuluva *Streptococcus oralisen* (normaalifloora) puhdasviljelmästä eristetyt DNA:n rpoB-monistuma (epäsymmetrinen Cy-5-dCTP-leimattu PCR-tuote). Esimerkkilasilla on nuolilla merkityt *S. pneumoniae* -leimattua kohdejuostetta sitovat oligospotit. Niissä olevien oligonukleotidien sekvenssit ovat taulukossa 3 esitetyt *S. pneumoniae* -oligonukleotidikoettimet 5 ja 6. Signaalin antoivat myös positiivista kontrollioligonukleotidiä sisältävät oligospotit molemmalla lasella (universaali PCR-aluke sekvenssinumero 21). Positiiviset kontrollispotit osittavat hybridisaatioreaktion onnistumista, vaikkapa bakteerispesifistä sitoutumista ei tapahdu. *S. oralis* -spesifisiä oligonukleotidispotteja näytelevyllä (-siruilla) ei ole. Kahden kuvan vertailu osoittaa, että normaaliflooran bakteeri *S. oralis* ei ristireagoi *S. pneumoniae* (patogeeni) -oligospottien kanssa, koska toisella näytesirulla, jotka oli hybridisoitu *S. oralis* rpoB-monistuman kanssa, ei tapahdu bakteerispesifistä hybridisaatiota. *S. pneumoniae* kohdejuoste ei sitou-
- 20
- 25
- 30

Esimerkki 6. Potilasnäytteiden analysointi

- Kliinisistä näytteistä, jotka oli saatu hengitystieinfektiosta kärsiviltä potilailta, eristettiin ja monistettiin DNA esimerkissä 4 kuvatulla tavalla ja testattiin käyttäen esimerkissä 5 kuvattua koetinlasia, johon oli kiinnitetty taulukossa
- 35 3 luetellut koettimet sekä positiivisina kontrolleina toimivat PCR-alukkeet.

- Samat näytteet analysoitiin myös viljelymenetelmällä. Yhteenveto tutkituista potilasnäytteistä on esitetty taulukossa 4. Keksinnön mukaisella menetelmällä saadut tulokset ovat samat kuin tunnetun tekniikan mukaisella viljelymenetelmällä saadut tulokset. Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä on oleellisesti nopeampi, koska tulos saadaan noin vuorokaudessa viljelymenetelmää käyttäessä.

Taulukko 4. Keksinnön mukaisen menetelmän vertailu viljelymenetelmän kanssa

Välikorvatulehdus, märkänäyte	Viljelytulos	Hybridisaatiotulos
C130	Sp, Hi	Sp Hi
C131	Sp	Sp, Sa
C132	Sp, Sa	Sp, Sa
C156	Hi, Cd	Hi, Cd
C146	Hi	Hi

10

Taulukossa esitettyjen lyhenteiden merkitykset: Sp - *Streptococcus pneumoniae*, Hi – *Haemophilus influenzae*, Sa – *Staphylococcus aureus*, ja Cd – *Corynebacterium diphtheriae*.

Patenttivaatimukset

1. Diagnostinen menetelmä infektioita aiheuttavan bakteerin osoittamiseksi ja tunnistamiseksi kliinisestä näytteestä, t u n n e t t u siitä, että

5 a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan käyttäen DNA-alukeseosta, joka sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat infektioita aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät sekvenssien tunnusnumerot 20 ja 21 mukaiset sekvenssit ja/tai
10 niiden kanssa komplementaariset sekvenssit ja/tai näiden toiminnalliset fragmentit,

b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen halutun yhdistelmän kanssa oligonukleotidikoetinsekvenssejä, jotka hybridisoituvat normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektioita aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun
15 RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevan hypervarioivan alueen sekvenssin kanssa ja jotka ovat bakteerilajispesifisiä, hybridisaatio-olosuhteissa ja

c) todetaan mahdollinen hybridisaatiokompleksin muodostuminen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen diagnostinen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että mainitut infektioita aiheuttavat bakteerit ovat hengitystieinfektioita ja/tai korva-, nenä- ja kurkkutauteja aiheuttavia bakteereja.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu hypervarioiva alue on bakteerin *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis* ja *Neisseria gonorrhoeae* *rpoB*-geenin hypervarioivan alueen sekvenssi.
25

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) käytettävien oligonukleotidikoetinsekvenssien pituus on 15 - 30, edullisemmin 19 - 30 ja edullisimmin 19 - 26 nukleinihappoa ja ne ovat mahdollisesti leimattuja.
30

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että oligonukleotidikoetinsekvenssiyhdistelmä käsittää kaikki tai osan sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai mainittujen sekvenssien kanssa käänteiset ja/tai komplementaariset sek-
35

venssit tai näiden toiminnalliset fragmentit ja edullisesti se käsittää kaikki sekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19.

6. Patenttivaatimuksen 5 tai 6 mukainen diagnostinen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittu oligonukleotidikoetinyhdistelmä on kiinnitetty kiinteälle kantajalle, edullisesti käsitellylle lasille.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen diagnostinen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan polymeerasiketjureaktiota käyttäen ja että vaiheessa b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen kiinteälle kantajalle kiinnitettyjen bakteerilajispesifisten oligonukleotidikoettimien kanssa.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen diagnostinen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa a) kliinisestä näytteestä eristetyn DNA:n monistuksessa käytetään sopivasti leimattua nukleotidiä todettavissa olevan kohdejuosteen aikaansaamiseksi ja että vaiheessa b) monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteään kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty kaikki bakteerilajispesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai niiden käänteiset ja/tai komplementaariset sekvenssit.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen diagnostinen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa b) monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteään kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty tietyille tai muutamalle hengitystieinfektioita aiheuttavalle bakteerille spesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on taulukossa 3 annettut vastaavat sekvenssitunnusnumerot, ja/tai niiden komplementaariset sekvenssit.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa c) käytetään mikrosirutekniikkaa.

11. DNA-alukeseos, tunnettu siitä, että se sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat infektioita aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät sekvenssit tunnusnumerot 20 ja 21 mukaiset sekvenssit ja/tai niiden kanssa komplementaariset sekvenssit tai näiden toiminnalliset fragmentit.

12. Oligonukleotidikoetinsekvenssi, tunnettu siitä, että se hybridisoituu normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektioita aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavi-

en *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevan hypervarioivan alueen sekvenssin kanssa, joka on bakteerilajispesifinen ja se on jokin sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai näiden kanssa käänteisistä ja/tai komplementaarista sekvensseistä ja/tai näiden toiminnallisista fragmenteista.

13. Oligonukleotidikoetinsekvenssiyhdistelmä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa yhdistelmän sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai näiden kanssa käänteisistä ja/tai komplementaarista sekvensseistä ja/tai näiden toiminnallisista fragmenteista, ja edullisesti sisältää kaikki sekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukaisen oligonukleotidikoetinsekvenssiyhdistelmän käyttö bakteerien toteamiseen, tunnistamiseen tai luokitteluun.

15. Infektioita aiheuttavien bakteerien DNA-ohjatun RNA-polymeraasin [EC:2.7.7.6] alayksikköä B koodaavien *rpoB*-geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevalta hypervarioivalta alueelta peräisin olevien bakteerilajispesifiset oligonukleotidikoetinsekvenssien käyttö bakteerilajispesifisinä hybridisaatiokoettimina.

16. Patenttivaatimuksen 16 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että mainitut bakteerilajispesifiset oligonukleotidikoetinsekvenssit käsittävät oligonukleotidikoetinsekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 19, ja/tai niiden käänteiset ja/tai komplementaariset sekvenssit.

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita, jotka ovat käyttökelpoisia bakteerien tunnistamisessa ja bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoimisessa. Erityisesti keksintö koskee spesifisiä nukleiinihappokoettimia, jotka ovat peräisin infektoita aiheuttavien bakteerien RNA-polymeraasia koodaavan geenialueen alayksikköä B, rpoB (DNA directed RNA polymerase subunit B), konservoituneiden alueiden lähellä olevilta hypervarioivilta alueilta. Keksintö koskee myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin rpoB:n konservoituneilta alueilta. Lisäksi keksintö koskee näiden nukleiinihappokoettimien ja universaalien alukkeiden käyttöä bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoinnissa sekä diagnostisia menetelmiä, joissa käytetään näitä nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita.

(57) Sammandrag

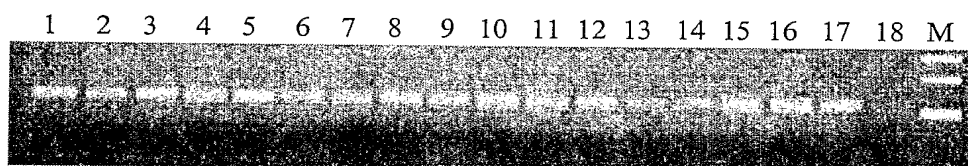
Uppfinningen avser nukleinsyrasonder och universala primer, som är användbara vid identifiering av bakterier och vid diagnostisering av infektioner som orsakas av bakterier. Uppfinningen avser i synnerhet specifika nukleinsyrasonder, som härstammar från hypervarierande områden nära konserverade områden av ett genområde som kodar för underenhet B av en bakteriell RNA-polymeras, rpoB (DNA directed RNA polymerase subunit B) av bakterier som orsakar infektioner. Uppfinningen avser även universala primer, som härstammar från konserverade områden av rpoB. Dessutom avser uppfinningen användning av dessa nukleinsyrasonder och universala primer vid diagnostisering av infektioner orsakade av bakterier samt diagnostiska förfaranden, i vilka dessa nukleinsyrasonder och universala primer används.

L5

/

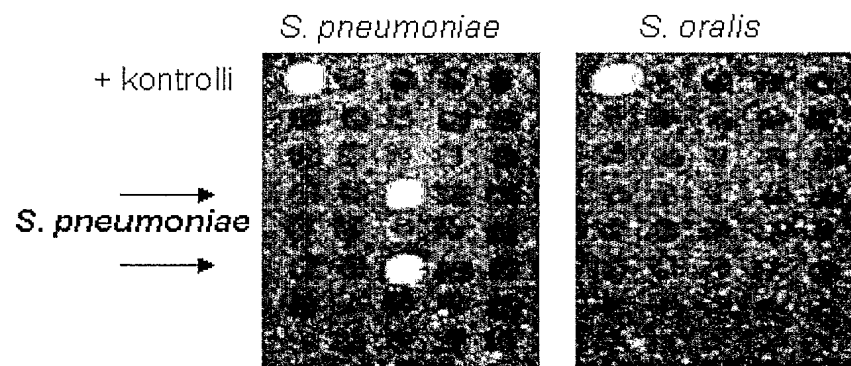
5' - TAAGTTGGCAGGGCGCCATGGTAACAAAGGGGTTATCTCTAAG
GTTGTCCCAGTAGCGGACATGCCCCA~~CTTAGAAGATGGTACTCCAGTCGACAT~~
CCTCTTAAACCCACTGGGGGTACCGAGT - 3'

Kuvio 1



Kuvio 2

Kuvio 3



L 6

2032195.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Mobidiag Oy

<120> Nukleiinihappokoettimia, universaaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään

<130> 20321195FI

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 1
gttatctcga aaattaaccc agttg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 2
cgatgaaaat ggtcagccag ttgaa

25

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 3

		2032195.ST25.txt	
gtcgttttcac	gtattgtacc	agt	23
<210>	4		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Streptococcus pyogenes		
<400>	4		
ttccagacgg	aacaccagtt	gac	23
<210>	5		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	Streptococcus pneumoniae		
<400>	5		
ttccagacgg	aactccagtc	ga	22
<210>	6		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	Streptococcus pneumoniae		
<400>	6		
cagacggaac	tccagtcgac	at	22
<210>	7		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Pseudomonas aeruginosa		
<400>	7		
caacggcacc	ccggtcgaca	t	21
<210>	8		
<211>	20		
<212>	DNA		

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 8
tggaagacat gccgcacgat 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 9
gcctgttgag gatatgccac a 21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 10
tggaagatgg aacagcagta gaca 24

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 11
tacgatgaaa acggtactcc g 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 12
caacccgatc gaagatatgc c 21

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 13
tatgccttac ttaccagatg gac

23

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 14
taccagatgg acgtccgatc

20

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 15
cagtagcgga catgcccga

19

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 16
ttagaagatg gtactccagt cgaca

25

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 17
atggcgacg gccgtcctgt g 21

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 18
aaatggtaat cctgtagata tcgtac 26

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 19
ctgcctcagg aagatatgcc at 22

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> y is c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n is a or g or c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> h is a or c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> y is c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> w is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> y is c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> r is a or g

<400> 20
gcyggncghc ayggwaayaa rgg

23

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> y is c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> s is c or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> v is a or c or g

<220>

<221> misc_feature

<223> d is a or g or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> y is c or t

<400> 21
ggyacscvva gdgggttya

19

<210> 22

<211> 71

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 22
 gggtgtatca cgcattcatgc cagttgagga tatgccatat gatgaaaatg gtaatcctgt 60
 agatatcgta c 71

<210> 23

<211> 71

<212> DNA

<213> Moraxella cuniculi

<400> 23
 gggtgtatca cgcattatgc cagttgagga tatgccttat gatgaaaacg gcaatcctgt 60
 ggacatcgta c 71

<210> 24

<211> 71

<212> DNA

<213> Moraxella caviae

<400> 24
 cgtgggtatca cgcattcatgc cagtagaaga catgccttat gatgaaaatg kcaaccctgt 60
 ggacatcgta c 71

<210> 25

<211> 71

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 25
 tgtgggtatct cgcattctgc ctgtggaaga catgccgtac atggcggacg gccgtcctgt 60
 ggacatcgta c 71

<210> 26

<211> 71

<212> DNA

<213> Haemophilus ducreyi

<400> 26
 cgtcatctcg aagatcctgc cgctcgagga catgccgttc ctggcggacg gcaccccggt 60
 ggacatcgtg c 71

<210> 27

<211> 71

<212> DNA

<213> Haemophilus parainfluenzae

<400> 27
 tgttatctca aaaatcaacc ctgtggaaga tatgccatac gatgaaaacg gtcaaccggt 60
 tgaaatcgta t 71

<210> 28

<211> 71

<212> DNA

<213> Streptococcus oralis

<400> 28
 ggttgtctct cgtatcgttc ctgtagaaga catgccttac cttccagatg gaactccagt 60
 cgatatcatg t 71

<210> 29

<211> 71

<212> DNA

<213> Streptococcus mitis

<400> 29
 ggttgtctct cgtatcgttc ctgtagaaga tatgccttac cttccagatg gaactccagt 60
 cgatatcatg t 71

<210> 30

<211> 71

<212> DNA

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 30
tgtcgtgggc aagatcctgc ctcaggaaga tatgccattc atgccagacg gcaccccagt 60
ggacatcatc c 71

<210> 31

<211> 71

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 31
ggtgatctcg attgttgtgc ctgttgagga tatgccacat atggaagatg gaacagcagt 60
agacatcggt c 71

<210> 32

<211> 71

<212> DNA

<213> Pasteurella pneumotropica

<400> 32
ggttatctca aaaatcaatc cggtggaaga tatgccgtat gatgaaaacg gtcaaccggt 60
tgaaattgtg t 71